

LAW OFFICES
MILLEN, WHITE, ZELANO & BRANIGAN, P.C.
ARLINGTON COURTHOUSE PLAZA I
SUITE 1400
2200 CLARENDON BOULEVARD
ARLINGTON, VIRGINIA 22201

Atty's Docket No. PATWA-2

jc511 U.S. PTO
09/469606
12/22/99

• TELEPHONE: (703) 243-6333
• CABLE: USALAW
• INT'L TELEX: 64191
• TELECOPIER: (703) 243-6410

Applicant(s) : Heinz Peter VOLLMERS, Wuerzburg, Germany
Hans Konrad MUELLER-HERMELINK, Wuerzburg, Germany

For : SUBSTANZ ZUR GEWINNUNG HOCHWIRKSAMER TUMORARZNEIEN SOWIE
VERFAHREN

The Honorable Commissioner
of Patents and Trademarks
Washington, D.C. 20231

SUBMISSION OF APPLICATION UNDER 37 C.F.R. §1.53(f) IN GERMAN

Sir:

Herewith is the above-identified application for Letters Patent including:

Applicant(s) Name(s) : Heinz Peter VOLLMERS, Wuerzburg, Germany
Hans Konrad MUELLER-HERMELINK, Wuerzburg, Germany

Assignee (by unrecorded assignment) :

Pages of Application: Specification - 31
Claims - 5
Abstract - 1
Sheets of Drawings - 16

NO DECLARATION IS ATTACHED.

■ The benefit under 35 U.S.C. §119 is claimed of the filing date of:

German 198 59 248.5 filed December 22, 1998 AND
German 199 09 771.2 filed March 5, 1999

Respectfully submitted,

MILLEN, WHITE, ZELANO & BRANIGAN, P.C.

By: Anthony J. Zelano (Reg. No. 27,969)
Representative Capacity

MILLEN, WHITE, ZELANO & BRANIGAN, P.C.
Arlington Courthouse Plaza I
2200 Clarendon Boulevard, Suite 1400
Arlington, Virginia 22201
(703) 812-5311 [direct dial]
Internet Address: zelano@mwwb.com

Filed: December 22, 1999

Substanz zur Gewinnung hochwirksamer Tumorarzneien sowie Verfahren**Beschreibung**

5

Die Erfindung betrifft eine Substanz sowie ein Verfahren zur Gewinnung von Antitumormitteln.

Beim Magenkarzinom handelt es sich um eine der weltweit häufigsten

10 Krebsarten. Nach Lauren "The two histological main types of gastric carcinoma", Acta Path Microbiol Scand; 64:331-49, werden sie histologisch eingeteilt in diffuse Adenokarzinome und intestinale Adenokarzinome. Intestinale Magenkarzinome sind oft von chronischer Gastritis B begleitet und insbesondere von intestinalen Metaplasien, die als Vorläufer dysplastischer Veränderungen und von Magenkarzinomen betrachtet werden. Unterschiede zwischen diesen beiden Arten zeigen sich auch darin, daß Patienten mit Karzinomen des diffusen Typs oft der Blutgruppe A angehören, woraus auf den Einfluß genetischer Faktoren beim Krebsrisiko geschlossen werden kann, während Umweltfaktoren, z.B. eine Helicobacter pylori-Infektion, möglicherweise für die Entstehung von Karzinomen des intestinalen Typs von Bedeutung sind. Zwar ist eine abnehmende Häufigkeit der Magenadenokarzinome im Westen festzustellen, dafür treten sie aber nun vermehrt im Osten auf.

25 Die Therapie war bislang auf Gastrektomie und Lymphadenektomie beschränkt, aufgrund der auch dann noch schlechten Prognose besteht jedoch der Bedarf nach einer neuen begleitenden Therapie. Immunologische Studien haben gezeigt, daß auch in Fällen, in denen das Immunsystem maligne Zellen nicht wirksam bekämpfen kann. Zwar ist eine zelluläre und humorale Aktivität meßbar, aber nicht ausreichend, um die Tumorzellen zu zerstören. Ein wirkungsvoller Ansatz ist nun der, von der Immunantwort des Patienten stammende Antikörper zu isolieren, geeignet zu vermehren und

- 2 -

therapeutisch einzusetzen. So wurden beispielsweise von Patienten mit Lungen-, Ösophagus- und Dickdarmkrebs stammende Antikörper isoliert und davon humane monoklonale Antikörper abgeleitet, die z.B. direkt Differentiation und das Wachstum der Tumorzellen beeinflussen, welche aber zumeist das Problem der Wechselwirkung mit anderen Tumoren oder gesunden Zellen haben.

Es ist bekannt, daß humane monoklonale SC-1-Antikörper Apoptose bei Magenkarzinomzellen auslösen können (Vollmers et al., Cancer 49 (1989), 2471-2476). Der Antikörper reagiert mit nahezu allen Adenokarzinomen vom diffusen Typ und etwa 20 % der Adenokarzinome vom intestinalen Typ (Vollmers et al., Cancer 76 (1995), 550-558; Vollmers et al., Cancer 79 (1997), 433-440). In klinischen Untersuchungen wurde gefunden, daß der Antikörper SC-1 in der Lage ist, eine tumorspezifische Regression und Apoptose bei primärem Magenkrebs ohne toxische Kreuzreaktivität gegenüber normalem Gewebe zu induzieren (Vollmers et al., Oncol. Rep. 5 (1998), 549-552).

Apoptose ist der programmierte Zelltod, Selbstmord von Zellen, durch Fragmentation der DNA, Zellschrumpfung und Dilatation des endoplasmatischen Reticulums, gefolgt von Zellfragmentation und der Bildung von Membranvesikeln, den sog. apoptotischen Körpern. Apoptose, die physiologische Form des Zelltods, garantiert eine schnelle und saubere Entfernung unnötiger Zellen, ohne Entzündungsvorgänge oder Gewebsverletzungen auszulösen wie im Falle der Nekrose. Unter pathologischen Bedingungen dient sie auch zum Entfernen maligner Zellen, wie etwa Krebsvorläuferzellen. Sie kann durch verschiedenste Stimuli ausgelöst werden, wie etwa durch zytotoxische T-Lymphozyten oder Zytokine, wie Tumornekrosefaktor, Glukokortikoide und Antikörper. Sie ist die häufigste Todesursache eukaryontischer Zellen und kommt vor in der Embryogenese, Metamorphose und Gewebsatrophie. Apoptotische Rezeptoren an der Zelloberfläche, wie jene der NGF/TNF-Familie werden prädominant auf

- 3 -

Lymphozyten exprimiert, befinden sich aber auch auf verschiedenen anderen Zelltypen, weshalb sie sich nicht für eine Krebstherapie eignen. Insbesondere haben bei in-vivo-Tests Liganden und Antikörper für diese Rezeptoren zu Leberschäden geführt. Deshalb sind tumorspezifische Rezeptoren mit apoptotischer Funktion besonders wichtig.

Der zelluläre Rezeptor des monoklonalen Antikörpers SC-1 war bisher nicht bekannt. Im Rahmen der zur vorliegenden Erfindung führenden Untersuchungen konnte dieser zelluläre Rezeptor identifiziert werden. Diese Identifizierung gestaltete sich jedoch als schwierig. Einerseits reagiert der monoklonale Antikörper SC-1 bei der Westernblot-Analyse mit seinem Rezeptor nur unter ganz bestimmten Stringenzbedingungen. Andererseits findet man eine durch Denaturierungsartefakte hervorgerufene unspezifische Reaktion mit einer Reihe weiterer Proteine.

Bei dem zellulären Rezeptor des Antikörpers SC-1 handelt es sich um eine für Tumorzellen, insbesondere für Magenkarzinomzellen spezifische Isoform des Proteins CD55/DAF (Medof et al., J. Exp. Med. 160 (1984), 1558-1578; Caras et al., Nature 325 (1987), 545-549; Bjorge et al., Int. J. Cancer 70 (1997), 14-25), die in normalem Gewebe nicht auftritt. Die spezifischen Rezeptoreigenschaften dieser Isoform beruhen auf einer besonderen mit dem Proteinrückgrat über eine N-Verknüpfung verbundenen Glykostruktur. Der tumorspezifische Rezeptor kann in einem Screeningverfahren zur Identifizierung von spezifischen Bindepartnern eingesetzt werden. Spezifische Bindepartner an den Rezeptor sind im Sinne der vorliegenden Erfindung solche Substanzen, die selektiv an eine tumorspezifische Glykostruktur, aber nicht signifikant an eine in normalen Zellen vorkommenden Glykostrukturen von CD55/DAF binden und vorzugsweise die Fähigkeit zur Apoptoseinduzierung besitzen. Diese spezifischen Bindepartner können für die Herstellung von therapeutischen Mitteln zur Apoptoseinduzierung oder/und zur Tumorbekämpfung sowie zur Herstellung von diagnostischen Mitteln eingesetzt werden.

- 4 -

Die Bindung des Antikörpers SC-1 an die tumorspezifische N-verknüpfte Glykostruktur des CD55/DAF-Proteins induziert eine Tyrosinphosphorylierung von drei Proteinen und die Aktivierung von Caspase-3 und Caspase-8. Weiterhin wurde gefunden, daß die durch den Antikörper SC-1 induzierte Apoptose zu einer transienten Zunahme der Präsentation von tumorspezifisch N-glykosyliertem CD55/DAF an der Oberfläche von Tumorzellen führt. Diese erhöhte Präsentation kann durch eine erhöhte Expression oder/und durch eine erhöhte Glykosylierung hervorgerufen werden. Anschließend verschwindet das tumorspezifisch N-glykosylierte CD55/DAF-Protein von der Zellmembran durch Endozytose. Weiterhin wird eine Spaltung von Cytokeratin 18, eine erhöhte Expression von c-myc und eine Abnahme der Expression von Topoisomerase II α und somit eine mindestens partielle Zellzyklusarrestierung beobachtet. Die durch SC-1 induzierten apoptotischen Prozesse führen nicht zu einer erhöhten Spaltung von Poly (ADP-Ribose)-Polymerase (PARP). Weiterhin findet man einen Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration, das aus einem intrazellulären Ca²⁺-Pool freigesetzt wird. Eine Inhibierung der Ca²⁺-Freisetzung inhibiert die durch SC-1 induzierte Apoptose.

Ein erster Aspekt der Erfindung betrifft ein Glykoprotein umfassend mindestens einen Abschnitt der Aminosäureprimärstruktur von CD55/DAF, insbesondere der membrangebundenen Isoform DAF-B und eine für Tumorzellen spezifische Glykostruktur, insbesondere eine solche Glykostruktur, die mit dem monoklonalen Antikörper SC-1 reagiert. Ein derartiges, beispielsweise aus der humanen Adenokarzinomzelllinie 23132 (DSM ACC 201) oder aus anderen humanen Adenokarzinomzelllinien, wie 3051 (DSM ACC 270) oder 2957 (DSM ACC 240), oder aus primären Tumorzellen von Magenadenokarzinompatienten erhältliches Glykoprotein weist bei SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (unter reduzierenden Bedingungen) ein scheinbares Molekulargewicht von etwa 82 kD auf. Neben diesem 82 kD Protein betrifft die Erfindung auch Varianten mit Deletionen, Insertionen oder/und Substitutionen in der Aminosäureprimärstruktur, die jedoch eine

- 5 -

dem natürlichen Protein analoge, d.h. tumorspezifische und vorzugsweise mit dem Antikörper SC-1 reaktive Glykostruktur besitzen.

Das erfindungsgemäße Glykoprotein kann erhalten werden, indem man Membranpräparationen aus Zellen, die ein Protein mit der gewünschten Glykostruktur exprimieren, z.B. aus Zellen der humanen Adenokarzinom-Zelllinie 23132 oder aus anderen humanen Adenokarzinomzelllinien herstellt und daraus das Glykoprotein durch chromatographische Verfahren z.B. durch Größenausschluß- oder/und Anionenaustauschchromatographie gewinnt. Die Herstellung der Membranpräparationen erfolgt vorzugsweise durch Lyse der Zellen in hypotonischem Puffer, Ultraschallbehandlung und anschließende Abtrennung der Zellkerne. Die Membranpräparationen können durch Zentrifugation aus dem verbleibenden Extrakt isoliert und durch chromatographische Methoden weiter aufgereinigt werden.

Das tumorspezifische CD55/DAF-Glykoprotein kann in einem Testverfahren eingesetzt werden, bei dem die Bindefähigkeit einer Substanz an das tumorspezifische Glykoprotein, insbesondere an dessen Glykostruktur bestimmt wird. Das Testverfahren kann als Hochdurchsatz-Screeningverfahren automatisiert werden. Hierzu kann das Glykoprotein in isolierter Form, als Zellextrakt, insbesondere als Membranpräparation oder in Form vollständiger Zellen, insbesondere der humanen Adenokarzinomzelllinie 23132 oder einer anderen humanen Adenokarzinomzelllinie, oder einer mit dem CD55-Gen transformierten heterologen eukaryontischen Zelle, z.B. einer Säuerzelle, die in der Lage ist, ein Protein mit der richtigen Glykostruktur zu erzeugen, eingesetzt werden. Als Kontrolle kann die Bindung der getesteten Substanz an ein Nichttumor-CD55/DAF-Glykoprotein untersucht werden, das aus normalen humanen Zellen oder Zelllinien erhältlich ist. Substanzen, die selektiv an das tumorspezifische Glykoprotein binden, sind zur Herstellung von therapeutischen oder/und diagnostischen Mitteln geeignet.

- 6 -

Vorzugsweise bestimmt man weiterhin die Fähigkeit der getesteten Substanz zur Apoptoseinduzierung, insbesondere bei Tumorzellen oder/und die Fähigkeit zur Induzierung einer über CD55/DAF vermittelten Phosphorylierungskaskade. Die Induzierung der Apoptose kann durch morphologische Zelluntersuchungen, durch Apoptosetestverfahren, z.B. durch einen Adhäsionstest (Vollmers et al., Cell 40 (1985), 547-557), durch Bestimmung der Keratin 1- und DNA-Fragmentierung, oder durch Proliferations-
5 tests wie dem MTT-Protiferationstest durchgeführt werden. Alternativ kann auch eine Bestimmung von Caspase-Aktivitäten, beispielsweise von Aktivitäten von Caspase-8 und/oder Caspase-3 oder eine Bestimmung der 10 intrazellulären freien Calciumkonzentration erfolgen. Substanzen, die selektiv eine Apoptose von Tumorzellen induzieren, können als antitumorwirksame 15 Substanzen eingesetzt werden. Die Induzierung der Phosphorylierungskaskade kann durch Verwendung von für Phosphorgruppen, z.B. Phosphotyrosin- oder/und Phosphoserin-Gruppen spezifischen Antikörpern verfolgt werden.

Zweckmäßigerweise werden pharmakologisch verträgliche Substanzen getestet. Hierzu zählen niedermolekulare pharmakologische Wirkstoffe, 20 insbesondere jedoch Peptide, Peptidmimetika, Antikörper, z.B. polyklonale, monoklonale, oder rekombinante Antikörper, Antikörperfragmente oder Antikörperderivate. Weitere Beispiele für Liganden des CD55/DAF-Rezeptors sind Aptamere (NexStar Pharmaceuticals, 2860 Wilderness Place, Boulder, Colorado 80301, USA) und Spiegelmere (Noxxon Pharma, Gustav-Meyer- 25 Allee 25, 13355 Berlin). Besonders bevorzugt sind beispielsweise rekombinante Antikörper wie etwa einzelkettige scFv-Antikörper, wie sie beispielsweise in Bakterienzellen wie etwa E.coli (Plückthun, Bio/Technol- 30 gie 9 (1991), 545-551 und darin zitierte Literaturstellen) oder auch in eukaryontischen Wirtszellen (Reff, Curr. Opinion Biotech. 4 (1993), 573- 576 und Trill et al., Curr. Opinion Biotech. 6 (1995), 553-560 oder darin zitierte Literaturstellen) erzeugt werden können. Weiterhin bevorzugt sind humane Antikörper, d.h. Antikörper mit humanen konstanten Domänen, wie

- 7 -

sie im menschlichen Körper, z.B. von Karzinompatienten, erzeugt werden, oder chimäre und humanisierte Antikörper, bei denen ursprünglich vorhandene nichthumane konstante Domänen oder/und Frameworkregionen durch entsprechende humane Bereiche ausgetauscht wurden. Beispiele für

5 Antikörperfragmente sind Fab-, F(ab)₂- oder Fab'-Fragmente, wie sie durch proteolytische Spaltung von Antikörpern erhalten werden können. Zu den Antikörperderivaten zählen beispielsweise Konjugate von Antikörpern mit Markierungsgruppen oder/und Effektorgruppen, beispielsweise toxischen Substanzen wie etwa Choleratoxin oder *Pseudomonas* Exotoxin A oder

10 radioaktiven Substanzen.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist die Verwendung von Substanzen, die spezifisch an das erfindungsgemäße Tumorglykoprotein CD55/DAF binden (mit Ausnahme des bereits bekannten monoklonalen Antikörpers SC-1) zur

15 Herstellung von die Apoptose-induzierenden Mitteln oder/und zur Herstellung von Antitumormitteln oder/und zur Herstellung von Mitteln zur Tumordiagnostik. Eine tumorspezifische oder tumorselektive Bindung im Sinne der vorliegenden Anmeldung bedeutet vorzugsweise, daß eine

20 Substanz im immunhistochemischen Nachweis mit Tumorzellen, aber nicht signifikant mit anderen Zellen reagiert. Eine Induzierung der Apoptose im Sinne der vorliegenden Anmeldung bedeutet eine Erhöhung des Apoptose-

index, d.h. der Anteil apoptotischer Zellen nach Behandlung mit der Substanz gegenüber den proliferierenden Zellen ist höher als ohne Behandlung, vorzugsweise höher als 50%. Der spontane Apoptoseindex ohne

25 Behandlung liegt deutlich unter 10%, wobei der Nachweis von proliferierenden Zellen über das Antigen Ki67 erfolgen kann.

30 Noch ein weiterer Aspekt der Erfindung ist ein Verfahren zur Bereitstellung von die Apoptose-induzierenden Mitteln oder/und Antitumormitteln oder/und zur Herstellung von Mitteln zur Tumordiagnostik, wobei man eine potentiell

wirksame Substanz auf ihre Fähigkeit zur spezifischen Bindung an ein erfindungsgemäßes Glykoprotein testet und bei einem positiven Test-

- 8 -

ergebnis die Substanz in eine für pharmazeutischen Anwendungen geeignete Darreichungsform gegebenenfalls zusammen mit üblichen Hilfs-, Zusatz- und Trägerstoffen überführt.

5 Geeignete pharmazeutische Darreichungsformen enthalten den Wirkstoff in einer therapeutisch wirksamen Menge, insbesondere in einer antitumorwirksamen Menge. Die einem Patienten verabreichte Dosis und die Behandlungsdauer hängen von der Art und Schwere der Erkrankung ab. Geeignete Dosierungen für die Verabreichung von Antikörpern sind beispielsweise bei
10 Ledermann et al. (Int. J. Cancer 47 (1991), 659-664) und Bagshawe et al. (Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals 4 (1991), 915-922) beschrieben.

15 Der Wirkstoff kann alleine oder in Kombination mit anderen Wirkstoffen entweder gleichzeitig oder sequenziell verabreicht werden. Die pharmazeutische Zusammensetzung kann neben dem Wirkstoff weitere pharmazeutisch übliche Substanzen enthalten. Die Zusammensetzung kann beispielsweise oral, nasal, pulmonal oder durch Injektion verabreicht werden. Oral verabreichbare Zusammensetzungen können in Form von Tabletten, 20 Kapseln, Pulvern oder Flüssigkeiten vorliegen. Durch Injektion verabreichbare Zusammensetzungen sind üblicherweise in Form einer parenteral verträglichen wässrigen Lösung oder Suspension.

25 Außerdem betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Bekämpfung von Tumoren, wobei man einem Patienten, insbesondere einem humanen Patienten, eine antitumorwirksame Menge einer an ein erfindungsgemäßen Glykoprotein spezifisch bindenden Substanz mit Ausnahme des monoklonalen Antikörpers SC-1 verabreicht.

30 Bindpartner für tumorspezifische CD55/DAF-Proteine können auch für diagnostische Zwecke, z.B. zum Tumorimaging, eingesetzt werden. Geeignete Methoden für das Tumorimaging sind z.B. bei Steinstraesser et

- 9 -

al. (Clinical Diagnosis and Laboratory Medicine 2 ((1989), 1-11) beschrieben. Hierzu werden die Bindepartner vorzugsweise in Form von Konjugaten mit Markierungsgruppen, z.B. radioaktiven oder fluoreszierenden Markierungsgruppen eingesetzt. Alternativ können die Bindepartner auch unkonjugiert mit der zu testenden Probe inkubiert und anschließend mit einem sekundären Bindungsreagenz angefärbt werden.

Ein Gegenstand der Erfindung ist somit ein Verfahren zur Diagnose von Tumoren, wobei man eine zu testende Probe, z.B. eine Körperflüssigkeit oder eine Gewebeprobe, oder einen Patienten mit einer an ein tumorspezifisches CD55/DAF Glykoprotein bindefähigen Substanz in Kontakt bringt und das Vorhandensein, die Lokalisierung oder/und die Menge des Glykoproteins in der Probe oder im Patienten nachweist.

Noch ein Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung von Substanzen, welche spezifisch das Tumorglykoprotein CD55/DAF binden, zum Auslösen einer Phosphorylierungskaskade. Noch ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung von Substanzen, welche spezifisch an das Tumorglykoprotein CD55/DAF binden, zur transientes Erhöhung der Präsentation von Tumorglykoprotein CD55/DAF an der Zelloberfläche, die durch eine erhöhte Glykosylierung oder/und Expression hervorgerufen werden kann. Anschließend verschwindet das tumorspezifische Glykoprotein von der Zelloberfläche. Noch ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung von Substanzen, welche selektiv an das Tumorglykoprotein CD55/DAF binden, zur Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels. Substanzen, die spezifisch an das Tumorglykoprotein CD55/DAF binden, können auch als Mittel zur Zellzyklusarretierung eingesetzt werden. Schließlich betrifft die Erfindung auch die Verwendung von Substanzen, die spezifisch an das Tumorglykoprotein CD55/DAF binden, zur Induzierung von apoptotischen Prozessen, die keine Spaltung von PARP umfassen. Die Substanzen können gegebenenfalls als Konjugate mit Markierungs- oder/und Effektorgruppen eingesetzt werden.

- 10 -

Noch ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung von Substanzen, die spezifisch an das Tumorglykoprotein CD55/DAF binden, insbesondere des Antikörpers SC-1 zur Induzierung von Apoptose in ruhenden Tumorzellen. Dieser Befund ist nach Kenntnisstand der Erfinder bisher noch für keine tumorselektive Substanz bekannt gewesen.

Die das tumorspezifische Glykoprotein CD55/DAF bindenden Substanzen enthalten vorzugsweise multiple, d.h. mindestens zwei Bindungsstellen für CD55/DAF. Beispielsweise können die Substanzen drei, vier, fünf, sechs,

10 sieben, acht, neun, zehn oder mehr Bindungsstellen enthalten, so daß bei Bindung an zellständiges tumorspezifisches CD55/DAF eine Quervernetzung entsteht. Um Substanzen mit multiplen Bindungsstellen zu erhalten, können Bindemoleküle gegebenenfalls quervernetzt werden. Die Quervernetzung kann beispielsweise mittels chemischer Kopplung, z.B. über bifunktionelle Linkermoleküle, oder über hochaffine Wechselwirkungen, z.B. Streptavidin/Biotin, erfolgen. Auch wenn es sich bei dem CD55/DAF-Bindemolekül beispielsweise um Antikörper, z.B. IgG oder IgM, handelt, die bereits mehrere Bindungsstellen enthalten, kann durch Quervernetzung z.B. über Anti-IgG- oder Anti-IgM-Antikörper noch eine Verbesserung der Apoptose-induzierung erreicht werden. Die Verwendung von quervernetzten Antikörpern ist daher bevorzugt.

Die Zelllinie 23132 ist von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, unter dem Aktenzeichen DSM ACC 201 erhältlich.

Weiterhin wird die Erfindung durch die nachfolgenden Beispiele und Figuren erläutert. Es zeigen:

30 **Figur 1:** die Identifizierung von mit dem Antikörper SC-1 reaktiven Antigenen.

- 11 -

- a: Aufreinigung von SC-1 Antigenen aus Membranextrakten der Magenkarzinomzelllinie 23132.
- b: Sequenzierung eines als SC-1 Antigen identifizierten 82 kD Proteins durch Nanoelektrospray-Tandem-Massenpektroskopie.

Figur 2: der Einfluß einer Spaltung von GPI-Ankern durch Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C (PI-PLC) auf eine Anfärbung mit SC-1. Unbehandelte Magenkarzinomzellen der Zelllinie 23132 angefärbt mit SC-1 (a) und Anti-EMA (c); mit PI-PLC behandelte Zellen angefärbt mit SC-1 (b) und Anti-EMA (d) (400 x Vergrößerung).

Figur 3: das Ergebnis eines MTT Test mit dem Antikörper SC-1 bei Magenkarzinomzellen. Kontrolle: unbehandelte Zellen; SC-1: mit SC-1 behandelte Zellen; SC-1, PIPLC: mit Phospholipase und anschließend mit SC-1 behandelte Zellen.

Figur 4: das Ergebnis einer Analyse von mit einem CD55-Antisense-Vektor transient transfizierten Zellen. Zellen, die mit einem Kontrollvektor transfiziert wurden, zeigen ein normales Anfärbungsmuster mit SC-1 (a) und Anti-CEA (c). In mit dem Antisense-Vektor transfizierten Zellen ist die Anfärbung mit SC-1 verringert (b), während keine Änderung bei Anfärbung mit Anti-CEA (d) zu erkennen ist.

Figur 5: das Ergebnis eines Klenow-Fragmentierungstests. Transfizierte Zellen zeigen keine Apoptose ohne Induzierung mit SC-1 (e) im Vergleich zu einer positiven Kontrolle (f). Nach Inkubation mit SC-1 zeigen die mit dem Kontrollvektor transfizierten Zellen Apoptose (g), während die Mehrzahl der mit dem CD55

- 12 -

Antisense-Vektor transfizierten Zellen resistent gegenüber Apoptose ist (h).

Figur 6: eine quantitative Bestimmung der durch SC-1 induzierten Apoptose. Mit dem Kontroll- und dem CD-55 Antisense-Vektor transfizierte Zellen wurden mit SC-1 inkubiert und Cytopspins dieser Zellen mit dem Klenow DNA Fragmentierungskit angefärbt. Die Prozentzahlen apoptotischer Zellen wurden von zwei verschiedenen Personen durch Zählung Apoptose-positiver und negativer Zellen in drei verschiedenen Feldern mit jeweils etwa 500 Zellen bestimmt.

Figur 7: die Wirkung einer Deglykosilierung auf die Bindung des Antikörpers SC-1.

- a: Tumorzellen mit Puffer inkubiert und mit SC-1 angefärbt;
- b: mit N-Glykosidase und mit SC-1 inkubierte Zellen;
- c: mit Puffer und Anti-CD55 inkubierte Zellen und
- d: mit N-Glykosidase und Anti-CD55 inkubierte Tumorzellen.

Figur 8: Das Ergebnis eines MTT-Tests mit SC-1 bei der Magenkarzinom-Zelllinie 23132.

- a: Titration von SC-1;
- b: Quervernetzung von SC-1 mit Kaninchen-Anti-human IgM-Antikörpern;

Figur 9: die Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration nach Induzierung der Zelllinie 23132 mit SC-1. An Punkt 1 erfolgte die Zugabe von SC-1 bzw. Kontrollantikörper. An Punkt 2 wurden die Zellen mit Ringerlösung gewaschen.

- 13 -

5 Figur 10: das Expressions- und Aktivitätsmuster der Caspase 3 und 8 nach Induzierung mit SC-1.

10 a: Westernblot-Analyse der Caspase-3 und -8. Die Aktivierung von Caspase-3 aufgrund proteolytische Spaltung ist durch Auftreten des p20 Spaltprodukts zu erkennen.

15 b: das Ergebnis einer Aktivitätsbestimmung von Caspase-8. Ein vierfacher Anstieg der Caspase-8 Aktivität wurde 20 Stunden nach Induzierung der Apoptose gefunden.

20 Figur 11: die Phosphoryierungsmuster der Zell-Linie 23132 nach Induzierung der Apoptose.

25 a: Eine rasche Phosphorylierung von Tyrosinresten in Proteinen mit Molekulargewichten von etwa 110 kD und 60 kD sowie die Dephosphorylierung eines Serinrests in einem Protein mit etwa 35 kD wurde nach Induzierung der Apoptose mit SC-1 gefunden.

30 b: Eine Zunahme der Phosphorylierung eines Thyrosinrestes in einem 75 kD Protein mit einem Maximum nach 10 min wurde nach Induzierung der Apoptose gefunden.

35 Figur 12: eine Expressions- und Mutationsanalyse von p53.

40 a: 5 min nach Induzierung der Apoptose durch SC-1 wurde eine starke Zunahme der mRNA Konzentration gefunden, während die hohen p53 Proteinkonzentrationen unverändert bleiben.

b: eine Sequenzanalyse von p53 zeigte eine Mutation in Codon 273, die zu einem Aminosäureaustausch von Arg zu His führt.

- 14 -

Figur 13: eine Expressionsanalyse von p21.

Nach Induzierung der Apoptose wird eine Zunahme der p21 mRNA Konzentration gefunden.

5 Figur 14: eine Western Blot-Analyse von SC-1 induzierten Zellen.

a: CD55/DAF Expression (Anfärbung mit SC-1)

b: Spaltung von PARP (Anfärbung mit Anti-PARP-Antikörper)

c: Anfärbung mit Anti-Topoisomerase II α -Antikörper als Marker für zelluläre Proliferation

d: c-myc Expression (Anfärbung mit Anti-c-myc-Antikörper)

10

15

Figur 15: die Wirkung des Caspase-3 Inhibitors Ac-DEVD-CHO auf die SC-1-induzierte Apoptose.

20

Figur 16: den Nachweis einer tumorzellspezifischen Apoptose durch *in situ* Kernfärbung bewirkt durch Verabreichung des Antikörpers SC-1 an einem Primärtumor.

Figur 17: die Wirkung der Verabreichung des Antikörpers SC-1 auf einen Primärtumor.

a: Biopsieprobe vor Verabreichung von SC-1 (*in situ* Färbung auf Apoptose)

b: Primärtumor nach Verabreichung von SC-1 (*in situ* Färbung auf Apoptose)

c: Biopsie vor Verabreichung von SC-1 (histologische Regressionsanalyse)

d: Primärtumor nach Verabreichung von SC-1 (histologische Regressionsanalyse).

25

30

- 15 -

Beispiele

1. Material und Methoden

6 1.1 Zellkultur

Für alle Tests wurde die etablierte Magenadenokarzinomzelllinie 23132 (Vollmers et al., Virchows Arch. B. Zell. Pathol. Incl. Mol. Pathol. 63 (1993), 335-343) verwendet. Die Zellen wurden in RPMI-1640 mit 10% 10 fötalem Kälberserum und Penicillin/Streptomycin (beide 1%) bis zur Subkonfluenz kultiviert. Für die beschriebenen Testverfahren wurden Zellen mit Trypsin/EDTA abgelöst und zweimal mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) vor der Anwendung gewaschen. Die humane Hybridomzelllinie SC-1 wurde wie bei Vollmers et al. (Cancer Res. 49 (1989), 2471-2476) 15 beschrieben hergestellt und kultiviert.

1.2 Aufreinigung des Antikörpers SC-1

Der humane monoklonale Antikörper SC-1 wurde aus Massenkulturen unter 20 Verwendung von Kationenaustauschchromatographie gefolgt von Gelfiltration wie bei Vollmers et. al. (Oncology Reports 5 (1998), 35-40) beschrieben aufgereinigt.

1.3 Aufreinigung des SC-1-Rezeptors

Zur Präparation von Membranproteinen wurden geerntete Zellen in 25 hypotonischem Puffer (20 mM HEPES, 3 mM KCl, 3 mM MgCl₂) resuspendiert, 15 min auf Eis inkubiert und 5 min sonifiziert. Die Zellkerne wurden durch Zentrifugation (10.000 g, 10 min) pelletiert. Die Membranen wurden 30 durch Zentrifugation (30 min, 100.000 g) pelletiert und in Membranlysepuffer (50 mM HEPES, pH 7,4, 0,1 mM EDTA, 1 M NaCl, 10% Glycerin und

- 16 -

und 1 % Triton X-100) resuspendiert. Allen Lösungen wurde Complete® Proteaseinhibitor (Boehringer Mannheim, Deutschland) zugesetzt.

Die Aufreinigung der Antigene erfolgte durch Säulenchromatographie unter Verwendung einer FPLC-Einheit (Pharmacia, Freiburg, Deutschland). Für die Größenausschlußchromatographie wurde eine Pharmacia Superdex 200 Säule (XK16/60) mit 5 mg Membranproteinpräparation in Puffer A (100 mM Tris HCl pH 7,5, 2 mM EDTA, 40 mM NaCl, 1% Triton X-100) beladen. Das Säuleneluat wurde fraktioniert und in einer Westernblot-Analyse auf Reaktion mit dem Antikörper SC-1 untersucht. Positive Fraktionen wurden unter Verwendung von Puffer A auf eine MonoQ-Säule geladen. Die gebundenen Proteine wurden mit einem linearen Gradienten unter Verwendung von Puffer B (100 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 M NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton X100) fraktioniert und durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Anfärbung mit Coomassie bzw. Westernblot-Analyse untersucht. Positive Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und sequenziert.

1.4 Präparation von Zell-Lysaten nach Induzierung mit SC-1

Die Zellline 23132 wurde auf 100 mm Zellkulturschalen bis zur Subkonfluenz kultiviert. Der Antikörper SC-1 wurde in einer Endkonzentration von 30 µg/ml für die jeweils angegebene Zeitdauer zugegeben. Dann wurden die Kulturplatten einmal mit PBS gewaschen und die Zellen wurden mit SDS-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 6,8, 10 mM Dithiothreitol, 2% (w/v) SDS, 10% (v/v) Glycerin) direkt lysiert. Die Zellrückstände wurden mit einem Gummischaber gesammelt.

1.5 Gelelektrophorese und Blots

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter reduzierenden Bedingungen und das Western-Blotting von Proteinen wurde unter Verwendung von

- 17 -

Standardprotokollen wie bei Vollmers et al. (Cancer 79 (1997), 433-440) beschrieben durchgeführt. Nitrozellulosemembranen wurden mit PBS unter Zusatz von 0,1 % Tween-20 und 2% Magermilchpulver oder 3 % Rinderse-
rumalbumin (zur Bestimmung der Phosphorylierung) blockiert und anschlie-
ßend eine Stunde lang mit dem Primärantikörper inkubiert. Die Antikörper
wurden in folgenden Verdünnungen eingesetzt. SC-1 (human) 10 µg/ml
bzw. 15 µg/ml; Anti-Caspase-3 bzw. -8 (Ziege) (SantaCruz, Heidelberg,
Deutschland) 5 µg/ml, Streptavidin Anti-Phosphotyrosin-Konjugat (Klon PT-
66) 1:20.000 und Streptavidin Anti-Phosphoserin-Konjugat (Klon PSR-45)
1:30.000 (Sigma, München, Deutschland), Maus-Anti-Topoisomerase IIα-
Antikörper 1:1.000 (Neomarkers, Baesweiler, Deutschland), Anti-c-myc-
Antikörper 1:1.000 (Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland) und Anti-PARP-
Antikörper 1:1.000 (Pharmingen, Heidelberg, Deutschland). Die Sekundär-
antikörper Peroxidase-Kaninchen-Anti-Human-IgM-Konjugat oder Kaninchen-
Anti-Ziegen-Antikörper (Dianova, Hamburg, Deutschland) und Peroxidase-
konjugiertes Extravidin (Sigma) wurden mit dem SuperSignal Chemilumi-
neszenzkit von Pierce (KMF, St. Augustin, Deutschland) nachgewiesen.

1.6 Proteinsequenzierung

Eine Proteinbande mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 82 kD wurde durch eindimensionale Polyacrylamidgelektrophorese isoliert und durch Anfärbung mit Coomassie sichtbar gemacht. Die p82-Bande wurde im Gel mit Trypsin (Boehringer Mannheim, nichtmodifiziert, Sequenzierungs-
qualität) wie bei Shevchenko et al., (Anal. Chem. 68 (1996), 850-858) beschrieben gespalten. Der nicht aufgetrennte Pool von tryptischen Peptiden wurde durch Nanoelektrospray-Tandem-Massenspektrometrie wie von Wilm et al. (Nature 379 (1996), 466-469) beschrieben sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte auf einem API III Triple Quadrupol Massenspektrometer (PE Sciex, Ontario, Kanada). Die Sequenzen der Peptidfragmente wurden unter Verwendung der Tandem-Massenspektrometriedaten assembliert und durch Datenbankrecherchen den jeweiligen Proteinen zugeordnet.

- 18 -

1.7 RT-PCR

Die cDNA-Synthese aus Gesamt RNA der Tumorzellen 23132 erfolgte mit 5 µg Gesamt RNA unter Verwendung von M-MLV Reverser Transkriptase (Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland) gemäß den Angaben des Herstellers. Die PCR-Reaktionen wurden in einem Reaktionsvolumen von 25 µl mit 1,75 mM MgCl₂, 0,4 pM Primer, 200 µM von jedem dNTP und 1 U Taq Polymerase (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) durchgeführt.

10 Es wurden folgende PCR-Produkte erzeugt:

CD55 (640 bp Fragment aus dem Sequenzbereich von bp 382 bis 1022)
p53-Fragment 1 (850 bp Fragment aus dem Sequenzbereich von 91 bis 940) p53-Fragment 2 (800 bp aus dem Sequenzbereich von 492 bis 1294)

1.8 Klonierungsprozeduren

Die PCR-Produkte wurden aus einem Agarosegel unter Verwendung des Jetsorb Gelextraktionskits (Genomed, Bad Oeynhausen, Deutschland) aufgereinigt. Die Klonierung der PCR-Fragmente erfolgte mit dem pCR-Script Amp SK (+) Klonierungskit (Stratagene, Heidelberg, Deutschland).

Die Klonierung des Antisense-Vektors pHOOK2-CD55-anti erfolgte durch Glätten des CD55-PCR-Produkts mit Pfu-Polymerase und Klonierung in den mit SmaI geschnittenen Expressionsvektor pHOOK2 (Invitrogen, Leek, Niederlande). Ein Klon mit Antisense Richtung der Insertion unter Kontrolle des P_{CMV}-Promotors wurde für die Antisense-Experimente ausgewählt.

1.9 DNA-Sequenzierung

30 Acht positive Klone wurden unter Verwendung des DyeDeoxy Termination Cycle Sequencing Kit (Applied BioSystems Inc., Weiterstadt, Deutschland)

- 19 -

sequenziert und dem automatisierten DNA Sequenzer ABIPrism 373 analysiert. Beide Strände wurden unter Verwendung von T3 und T7 Primern sequenziert. Die Sequenzen wurden unter Verwendung der Computerprogramme DNASIS und BLAST analysiert.

5

1.10 Transfektion

Für Transfektionsexperimente wurden $2-5 \times 10^7$ abgelöste Zellen in Tris-gepufferter Salzlösung (TBS) gewaschen und in 400 μ l TBS resuspendiert.

10 Nach Zugabe von 10 μ g Plasmid DNA wurden die Zellen mit 240 V, 960 nF unter Verwendung eines Elektroporationsgeräts von BioRad (München, Deutschland) gepulst. 5×10^5 transfizierte Zellen wurden auf einer 60 mm Zellkulturschale ausgesät und für 24 h wie zuvor beschrieben inkubiert. Die Apoptose wurde durch Zugabe von 50 μ g/ml gereinigtem SC-1 Antikörper zum Wachstumsmedium induziert. Nach 24 h wurden die Zellen mit Trypsin behandelt und zur Herstellung von Cytospins verwendet.

15

1.11 Phospholipasetest

20 Abgelöste und deletierte Zellen wurden RPMI-1640 mit Zusätzen resuspendiert und für 90 min bei 37°C inkubiert. Nach dieser Erholungsperiode wurden 20 mU/ml PI-PLC (Boehringer Mannheim) zugegeben, und die Zellen für weitere 60 min inkubiert. Schließlich wurden die Zellen gewaschen und zur Herstellung von Cytospins verwendet.

25

1.12 Glycosidase-Test

Abgelöste und gewaschene Zellen wurden in RPMI-1640 mit 10% fötalem Kälberserum resuspendiert, 1 h auf Eis inkubiert, dann gezählt und Cytospins hergestellt. Nach Lufttrocknung wurden die Cytospinpräparationen mit Aceton fixiert (10 min), gewaschen und mit 20 μ U/ml O-Glykosi-

30

- 20 -

dase oder 5 mU/ml N-Glycosidase (Boehringer Mannheim) für 4 h bei 37°C inkubiert.

1.13 Immunhistochemische Anfärbung

5 Folgende Antikörper wurden für die immunhistochemische Anfärbung verwendet: Gereinigter Antikörper SC-1, Anti-CEA-Antikörper (DAKO, Hamburg, Deutschland) Anti-EMA-Antikörper (Loxo, Dossenheim, Deutschland) und Anti-CD55-Antikörper (Biozol, Eching, Deutschland). Die

10 Acetonfixierung und Anfärbung der Cytospinpräparationen erfolgte wie von Vollmers et al. (Hum. Antibodies Hybridomas 7 (1996), 37-41) beschrieben.

Zur immunhistochemischen Anfärbung von apoptotischen Zellen wurden bis 15 zur Subkonfluenz kultivierte Zellen mit gereinigtem Antikörper SC-1 (verdünt auf 50 µg/ml) in vollständigem Wachstumsmedium für bis zu 96 h inkubiert. Adhäsente und abgelöste Zellen wurden gesammelt, zentrifugiert und in vollständigem Wachstumsmedium resuspendiert. Nach einer Zellzählung wurden Cytospin-Präparate hergestellt und bei Raumtemperatur über Nacht getrocknet. Untersuchung der Spaltung von Cytokeratin 18 in 20 vivo wurden Biopsien von Patienten vor Behandlung mit SC-1 und Gewebebeschnitte nach Behandlung und Gastrektomie wie bei Vollmers et al., (Oncol. Rep. 5 (1998), 549-552) beschrieben entnommen.

Die Cytospins wurden mit Rinderserumalbumin (15 mg/ml) in phosphatge- 25 pufferter Salzlösung (PBS) für 30 min blockiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 1 h mit SC-1-Überstand, M30 Cyto Death-Antikörper (Roche Biochemicals, Mannheim, Deutschland) oder Maus-Anti-Cytokeratin 18 Antikörper (DAKO, Hamburg, Deutschland) 1:15 verdünnt. Anschließend wurde für 30 min in PBS gewaschen, gefolgt von einer Inkubation mit 30 Peroxidase-markiertem Kaninchen-Anti-Maus- oder Kaninchen-Anti-Human-Konjugat (DAKO) 1:25 verdünnt. Nach 30-minütigem Waschen mit PBS erfolgte die Anfärbung mit Diaminobenzidin (0.05 %) und Wasserstoff-

- 21 -

peroxid (0,02 %) für 3 min bei Raumtemperatur. Die Reaktion wurde mit Leitungswasser gestoppt und die Gewebeschnitte wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt.

5 **1.14 Apoptosetests**

Cytospinpräparationen (5000 Zellen/Objekträger) wurden in Aceton fixiert und dann mit TBS gewaschen. Anschließend wurden sie mit dem FragE1-Klenow DNA-Fragmentierungskit (Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers angefärbt.

10 Ein ELISA zum Nachweis der Apoptose wurde unter Verwendung des Cell Death Detection® Kit (Roche Biochemicals) nach der Vorschrift des Herstellers durchgeführt.

15 **1.15 MTT-Test**

Der MTT-Proliferationstest (Carmichael et al., Cancer Res. 47 (1987), 936-942) zur Bestimmung der Apoptoseaktivität des Antikörpers SC-1 auf Magenkarzinomzellen wurde wie bei Vollmers et al. (Cancer 76 (1995), 550-558) beschrieben durchgeführt. Die Bestimmung des Zellwachstums erfolgte durch den mitochondrialen Hydroxylase-Test (Mossmann, J. Immunol. Meth. 65 (1983), 55-63). Aus der Absorption der mit SC-1 induzierten Zellen und der nicht mit SC-1 induzierten Kontrolle wurde der prozentuale Anteil von apoptotischen Zellen bestimmt (Vercammen et al., J. Exp. Med. 188 (1998), 919-930).

20 **1.16 Caspase-3 und -8 Tests**

25 Die Aktivierung von Caspase-8 und Caspase-3 wurde mit dem ApoAlert™ Caspase Fluoreszenz-Testkit (Clontech, Heidelberg, Deutschland) bestimmt. Hierzu wurden 1×10^6 Zellen mit 40 µg/ml SC-1 für 7 bzw. 20 h inkubiert.

- 22 -

Dann wurden die Zellen gesammelt, in Zell-Lysepuffer resuspendiert und die Caspaseaktivität nach Angaben des Herstellers bestimmt.

1.17 Bestimmung von intrazellulärem freiem Calcium [Ca^{2+}]

Die Bestimmung der intrazellulären freien Calciumkonzentration wurde unter Verwendung des Calcium-sensitiven Farbstoffs Fura-2-AM wie von Grykiewicz et al. (J. Biol. Chem. 260 (1985), 3440-3450) beschrieben bestimmt. Hierzu wurden die Zellen mit einer Fura-2-AM in einer Endkonzentration von 5×10^{-6} M enthaltenden Ringerlösung (122,5 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 1,2 mM CaCl_2 , 0,8 mM MgCl_2 , 1 mM NaH_2PO_4 , 5,5 mM Glucose, 10 mM HEPES pH 7,4) für 15 min inkubiert. Nach Spülen wurden die Objekträger mit einem Axiovert 100 TV Mikroskop (400-fache Vergrößerung) untersucht. Das Fluoreszenzsignal wurde bei 500 nm mit zwischen 334 und 380 nm alternierenden Anregungswellenlängen unter Verwendung einer 100-W Xenon-Lampe und einer automatischen Filterwechselvorrichtung (Zeiss, Deutschland) gemessen. Die Konzentration von intrazellulärem freiem Calcium wurde nach der Methode von Grynkiewicz et al. (supra) unter Annahme einer Dissoziationskonstante von 225 nmol/l berechnet. Die maximalen und minimalen Fluoreszenzverhältnisse (R_{\max} und R_{\min}) wurden nach Zugabe von Kalibrierungslösungen gemessen. R_{\max} wurde nach Zugabe einer Ringerlösung mit 3 mM Ca^{2+} und 10^{-6} M Ionomycin bestimmt. R_{\min} wurde in Gegenwart einer Ca^{2+} freien Ringerlösung mit 3 mM EGTA und 10^{-8} M Ionomycin bestimmt.

1.18 Inhibition der intrazellulären Calciumfreisetzung

Zellen wurden einmal mit phosphatgepufferter Salzlösung gewaschen und für 24 h in Calcium-freiem DMEM-Medium ohne fötalem Kälberserum (FCS) gewaschen. Dann wurde aufgereinigter SC-1-Antikörper bis zu einer Endkonzentration von 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ zugegeben. Als Kontrolle wurden die gleichen Zellen ohne SC-1 verwendet. Die Zellen wurden in einem

- 23 -

befeuchteten Inkubator für weitere 24 oder 48 h inkubiert und dann mit 3 % Glutaraldehyd fixiert. Die Zellkulturplatten wurden dann mit Hilfe eines Lichtmikroskops auf morphologische Veränderungen untersucht.

5 2. Ergebnisse

2.1 Aufreinigung des SC-1-Rezeptors CD55

Bei Westernblot-Analyse von Extrakten aus Gesamtzell-Lysaten der Magenkarzinomzelllinie 23132, die unter Niedrigsalzbedingungen (100 mM NaCl) hergestellt worden waren, reagierte der Antikörper SC-1 mit einem Protein mit einer relativen Molekulargmasse von etwa 50 kD. Durch Änderung der Stringenz (1 M NaCl) und unter Verwendung von Membranpräparationen konnten weitere Proteine mit etwa 70 kD und etwa 82 kD nachgewiesen werden (Figur 1a, Spur 1). Diese Proteine wurden aus Membranfraktionen isoliert und durch sequenzielle Größenausschluß- und Anionenaustauschchromatographie gereinigt (Figur 1a, Spuren 2, 3). Die Moleküle wurden aus SDS-Polyacrylamidgelen ausgeschnitten und sequenziert.

20 Das 50 kD Protein wurde als Dihydrolipoamidsuccinyltransferase (Genbank-Zugriffsnr. L37418) und das 70 kD Protein als das humane Lupus p70 Autoantigenprotein (Genbank-Zugriffsnr. J04611) identifiziert. Bei diesen Proteinen handelt es sich um zytoplasmatische bzw. nukleäre Antigene. Da 25 der Antikörper SC-1 in immunhistochemischen Untersuchungen nur an Zelloberflächenantigene bindet, ist die Reaktivität vermutlich auf unspezifische Bindung aufgrund der Proteindenaturierung während der Westernblot-Analyse zurückzuführen.

30 Das 82 kD Protein wurde als CD55 (DAF, Genbank-Zugriffsnr. M31516, Figur 1b, Abschnitte 1 und 2) identifiziert. CD55 existiert beim Menschen in zwei genetisch bestimmten Isoformen (sekretiertes DAF-A und mem-

- 24 -

brangebundenes DAF-B) die durch differentielles Spleißen erzeugt werden (Caras et al., Nature 325 (1987), 545-549). Durch RT-PCR-Analyse wurde festgestellt, daß die Zelllinie 23132 nur die membranverankerte DAF-B Isoform exprimiert.

5

2.2 Phospholipase-Behandlung

Durch immunhistochemische Untersuchungen und im MTT-Proliferationstest wurde der Einfluß einer Abspaltung des Glykosidphosphatidylinositol (GPI)-

10 Ankers auf die Bindung von SC-1 analysiert. Hierzu wurde der GPI-Anker durch Inkubation mit Phosphatidylinositol-spezifischer Phospholipase C (PI-PLC) abgespalten. Cytospins von mit PI-PLC behandelten und unbehandelten Zellen wurden immunhistochemisch mit SC-1, Anti-CD55 und Anti-EMA (Epithelialmembran-Antigen) angefärbt. Ein Vergleich mit unbehandelten Zellen (Figur 2a) zeigt einen Verlust der Anfärbungsintensität bei mit PI-PLC- behandelten und SC-1 angefärbten Zellen (Figur 2b). Bei Anfärbung mit Anti-EMA (Figur 2c, d) wurde kein Unterschied in der Anfärbung gefunden, was darauf hinweist, daß die PI-PLC-Behandlung keine Wirkung auf nicht GPI-verankerte Membranproteine hat. Beim MTT-Test führte eine Behandlung von Zellen mit Phospholipase C zu einer signifikanten Abnahme ($p \leq 0,05$) der apoptotischen Zellen (Figur 3).

2.3 Transfektion mit Antisense-CD55 RNA

25 Die Zelllinie 23132 wurde mit dem CD55 Antisense-Vektor pHOOK2-CD55anti und dem Kontrollvektor pHOOK2 durch Elektroporation transient transfiziert. Zuerst wurden Cytospins von transfizierten Zellen immunhisto- chemisch mit SC-1, Anti-CD55 und Anti-CEA (Carcino-embryonales Antigen) angefärbt. Die mit dem Kontrollvektor transfizierten Zellen zeigten eine intensive Anfärbung mit SC-1 und CEA (Figur 4a, c). Bei mit dem CD55 Antisense-Vektor angefärbten Zellen wurde fast keine Anfärbung mit SC-1 gefunden (Figur 4b). Die Anfärbung mit Anti-CEA-Antikörper zeigte, daß das

- 25 -

Expressionsmuster des (auch GPI-verankerten) CEA nicht durch die Transfektion mit dem Antisense-Vektor beeinflußt wird. Folglich wurde die Expression von CD55 spezifisch aufgrund der Expression der Antisense RNA reduziert.

5

Um zu analysieren, ob die Expression von Antisense-CD55 RNA auch die SC-1 induzierte Apoptose hemmt, wurden die Zellen einen Tag nach der Transfektion mit und ohne 30 µg/ml SC-1 für eine Dauer von 24 h inkubiert. Cytospins von mit dem Antisense-Vektor und dem Kontrollvektor trans-

10 fizierten Zellen wurden mit dem FragE1 Klenow DNA Fragmentierungskit zum Nachweis einer durch Apoptose induzierten DNA-Fragmentierung angefärbt. Während mit beiden Plasmiden behandelte untransfizierte Zellen nahezu keine spontane Apoptose zeigen (Figur 5e), findet man nach Inkubation mit SC-1 eine deutliche Abnahme bei der Apoptose von mit dem CD55 Antisense-Vektor transfizierten Zellen (Figur 5g) im Vergleich zu mit dem Kontrollvektor transfizierten Zellen (Figur 5h).

15 Eine quantitative Bestimmung zeigte, daß spontane Apoptose in trans-
20 fizierten 23132 Zellen mit einer Häufigkeit von 6% auftrat, während nach Inkubation mit SC-1 85% der mit dem Kontrollvektor transfizierten Zellen eine Apoptose zeigten. Diese apoptotische Reaktion wurde durch Trans-
fektion mit dem CD55 Antisense-Vektor auf 21% verringert (Figur 6).

2.4 Glykosidasebehandlung

25

Der Einfluß einer Proteindeglykosilierung auf die Bindung von SC-1 an die Zell-Linie 23132 wurde durch Inkubation von Cytospin-Präparaten mit O- und N-Glykosidasen vor der immunhistochemischen Anfärbung untersucht. Eine Behandlung von Zellen mit N-Glykosidase führte zu einer signifikanten
30 Abnahme der SC-1 Anfärbung (Figur 7b), während eine Anfärbung mit Anti-CD55, der den Proteinanteil in der SCR3 Region erkennt, nicht durch Proteindeglycosilierung beeinflußt wurde (Figur 7d). Eine Inkubation mit

Phosphatpuffer und eine Behandlung mit O-Glycosidase hatte keine Wirkung auf die SC-1 Bindung. Dies zeigt, daß die Spezifität von SC-1 in N-verknüpften Zuckerresten und nicht in der Primärproteinsequenz lokalisiert sein muß.

5

2.5 Quervernetzung von CD55/SC-1

Die Zellen wurden 24 h mit zunehmenden Mengen an SC-1 inkubiert um die optimale apoptotische Aktivität von SC-1 zu bestimmen (Figur 8a). Dann erfolgte Quervernetzung bei einer Konzentration von 40 µg/ml SC-1 mit Kaninchen-Anti-Human IgM. Nach Inkubation für 48 h wurde ein 47% höherer Anteil an toten Zellen als bei mit SC-1 inkubierten Kontrollzellen gefunden (Figur 8b).

15

2.6 Calciumspiegel

Um zu untersuchen, ob die durch SC-1 induzierte Apoptose mit Änderungen des Calciumspiegels einhergeht, wurde die intrazelluläre Calciumkonzentration der Zelllinie 23132 nach Induktion mit SC-1 und Kontrollantikörper (unspezifisches humanes IgM) bestimmt. Dabei konnte ein signifikanter Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration etwa 1 min nach Zugabe des SC-1 Antikörpers gefunden werden, während der Kontrollantikörper keinen Einfluß hatte (Figur 9).

25

2.7 Caspase-Aktivität

Durch Westernblot-Analyse wurde gefunden, daß die Caspase-3 und -8 nach Induzierung der Zelllinie 23132 mit SC-1 nach oben reguliert werden (Figur 10a). Eine die Aktivierung von Caspaseen hervorrufende proteolytische Spaltung wurde für Caspase-3 durch Identifizierung des Spaltprodukts p20 nachgewiesen (Figur 10a). Bei Caspase-8 wurde ein vierfacher Anstieg der Aktivität 20 h nach der Induzierung mit SC-1 gefunden, was auf eine

- 27 -

wesentliche Beteiligung dieser Caspase beim Apoptose-Prozess hinweist (Figur 10b).

Die Zugabe des spezifischen Caspase-3-Inhibitors AC-DEVD-CHO (Alexis 5 Biochemicals, Grünberg, Deutschland) zeigte überraschenderweise mit steigender Konzentration eine Zunahme der Apoptose bei Bestimmung mit dem Cell Death Detection[®] Kit (Figur 15).

2.8 Proteinphosphorylierung

Das Phosphorylierungsmuster nach Induzierung der Zellen mit 40 µg/ml SC-1 10 Antikörper wurde durch Westernblot-Analyse von cytoplasmatischen und Membranextrakten untersucht. Dabei wurde eine frühe Tyrosinphosphorylierung von 110 kD und 60 kD Proteinen 30 bis 60 sec nach Induzierung der Apoptose gefunden (Figur 11). Das 60 kD Protein wurde nur im Cytoplasma 15 gefunden, während das 110 kD Protein sowohl im Plasma als auch im Membranextrakt nachweisbar war. Weiterhin wurde eine langsame Tyrosinphosphorylierung eines cytoplasmatischen 75 kD Protein mit einem Maximum nach 10 min sowie das vollständige Verschwinden der Serinphosphorylierung eines 35 kD Proteins 10 min nach Induzierung gefunden. 20

2.9 Expression und Sequenzierung von p53

Um die Rolle von p53 bei SC-1 induzierter Apoptose zu untersuchen, wurde 25 die Häufigkeit der mRNA durch RT-PCR und des Genprodukts durch Westernblot-Analyse nach Induzierung bestimmt. Dabei wurde ein deutlicher Anstieg der mRNA-Konzentration gefunden. Auf Proteinebene wurde jedoch eine konstante und nicht signifikant geänderte hohe Konzentration des p53 Genprodukts gefunden (Figur 12a).

30 Durch Amplifizierung von zwei p53 Fragmenten aus cDNA mit spezifischen Primern, Klonierung der PCR-Fragmente und Sequenzierung von acht Klonen

- 28 -

wurde die DNA-Sequenz von p53 in der Zelllinie 23132 bestimmt. Alle Klone mit das Exon 8 überspannenden Insertionen zeigten eine Mutation in Kodon 273, die zu einem Aminosäurenaustausch von Arginin zu Histidin führte (Figur 12b). Dies ist eine dominant negative Mutation, die häufig in Magenadenokarzinomen auftritt.

2.10 Expression von p21

Das Protein p21 ist ein mit der Expression von p53 assoziiertes Molekül. Ein

Test der Expression von p21 in der Magenkarzinomzelllinie 23132 nach Behandlung mit SC-1 ergab einen Anstieg nach 5 min gefolgt von einer Verringerung nach 60 min (Figur 13).

2.11 Expression von CD55/DAF nach Induzierung der Apoptose

Es wurde das Expressionsmuster von CD55/DAF nach Induzierung der Apoptose durch 50 µg/ml SC-1 mittels immunhistochemischer Anfärbung von Cytospin-Präparationen mit dem Antikörper SC-1 untersucht. Während nichtinduzierte Zellen eine leichte Membranfärbung mit dem Antikörper

SC-1 aufweisen, zeigten mit SC-1 induzierte Zellen eine intensive Membranfärbung 12 h nach Induzierung der Apoptose. Dies weist auf eine Erhöhung der CD55/DAF-Präsentation an der Zelloberfläche nach Bindung der Antikörper an die Zellen hin. Diese Membranfärbung verschwindet nach 48 h, und eine diffuse cytoplasmatische Anfärbung ist erkennbar.

Diese Anfärbung wird auch nach 96 h mit verringriger Intensität gefunden. Die Zunahme der CD55/DAF-Expression wurde auch bei einer Western Blot-Analyse mit Membranextrakten von apoptotischen Zellen nach SC-1-Induzierung gefunden. Während in nichtinduzierten Zellen CD55/DAF nicht nachweisbar ist, nimmt die CD55/DAF-Expression 1 h bis 6 h nach Induzierung zu. Nach 24 h nimmt die Expression von CD55/DAF ab, ist aber immer noch höher als in nichtinduzierten Zellen (Figur 14a).

- 29 -

2.12 Spaltung von Cytokeratin 18

Der Abbau von apoptotischen Zellen geht einher mit der proteolytischen Spaltung von Cytokeratin 18. Die Spaltung von Cytokeratin 18 in der Zelllinie 23132 nach SC-1 induzierter Apoptose sowie in Primärtumoren von Patienten, die mit 20 mg SC-1 48 h vor einer Tumorresektion behandelt worden waren, wurde untersucht. Eine M30 Cyto Death-Anfärbung zeigte eine geringe Menge apoptotischer Zellen ohne Induzierung von Apoptose, während die Anzahl apoptotischer Zellen bis 96 h zunimmt.

2.13 Molekulare Analyse der SC-1-Apoptose

Im Einklang mit den immunhistochemischen Anfärbungen zeigte die biochemische Analyse eine Zunahme der CD55/DAF-Moleküle, gefolgt von einer leichten Abnahme nach 24 h Inkubation mit SC-1 (Figur 14a). Die Spaltung von PARP wurde durch Western Blot-Analyse unter Verwendung von Gesamtzellextrakten aus SC-1 induzierten Zellen und murinem Anti-PARP-Antikörper untersucht. In fünf unabhängigen Experimenten wurde keine Spaltung von PARP gefunden, die sich durch das Auftreten eines 85 KD Spaltungsprodukts (Lazebnik et al., Nature 371 (1994), 346-347) nachweisen lassen würde (Figur 14b).

Um Veränderungen im Zellzyklus nach Induzierung der Apoptose zu untersuchen, wurde die Expression der Topoisomerase II α durch Western Blot-Analyse bestimmt. Die Topoisomerase II α ist ein Schlüsselenzym im Zellzyklus, das bei der DNA-Replikation beteiligt ist (Watt und Hickson, Biochem. J. 303 (1994), 681-695). Die verringerte Expression der Topoisomerase II α nach SC-1 induzierter Apoptose zeigt daher eine Zellzyklusarretierung für mindestens einen Teil der Zellen (Figur 14c).

Der Transkriptionsfaktor c-myc ist in verschiedenen apoptotischen Prozessen beteiligt und kann durch Transfektion in Zellen eine Apoptose

- 30 -

Induzieren (Evan et al., Cell 69 (1992), 119-128). Eine Untersuchung des Expressionsmusters von c-myc nach SC-1 induzierter Apoptose ergab eine erhöhte Expression 15 min nach Induzierung der Apoptose gefolgt von einer Abnahme nach 4 h (Figur 14d).

5

2.14 Wirkung einer Verringerung der extrazellulären und intrazellulären Calciumkonzentration auf die Apoptose

Es wurde untersucht, ob Ca^{2+} -Ionen aus dem Zellkulturmehrmedium aufgenommen werden oder aus intrazellulären Ca^{2+} -Reservoirs freigesetzt werden. Zur Bestimmung, ob Ca^{2+} aus dem Kulturmehrmedium aufgenommen wird, wurden die Zellen für 24 h in Serum- und Ca^{2+} -freiem DMEM-Mehrmedium inkubiert. Dann wurde gereinigter SC-1-Antikörper auf eine Endkonzentration von 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ zugesetzt und weitere 24 h inkubiert. Die Zellen wurden dann in 3 % Gluteraldehyd fixiert und in einem umgedrehten Lichtmikroskop untersucht. Verglichen mit Kontrollzellen (nicht mit SC-1 induziert) zeigten SC-1 induzierte Zellen morphologische, für eine Apoptose charakteristische Veränderungen, vergleichbar mit Zellen, die mit SC-1 in RPMI-Mehrmedium unter Zusatz von 10 % FCS inkubiert worden waren.

10
15
20
25

Der Einfluß von Ca^{2+} aus intrazellulären Ca^{2+} -Reservoirs wurde durch Inkubation von Zellen (kultiviert in serumfreiem DMEM-Mehrmedium) für 5 h mit 50 μM des zellpermeablen Chelators BAPTA (Alexis Biochemicals, Grünberg, Deutschland) untersucht. Die Zellen wurden für 24 h mit 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gereinigtem SC-1 inkubiert. Es konnten keine erkennbaren Veränderungen in der Zellmorphologie beobachtet werden, was darauf hinweist, daß keine Apoptose induziert wurde. Auch durch ELISA konnte eine durch BAPTA bewirkte Hemmung der Apoptose gefunden werden.

30

- 31 -

2.15 Nachweis von Apoptose in Primärtumoren

Die Verabreichung des Antikörpers SC-1 an Magenkarzinom-Patienten führte zu einer deutlich erkennbaren tumorzellspezifischen Apoptose, wie durch *in situ* Kernfärbung nachgewiesen wurde (Figur 16). Während in Tumorbiospien, die vor der Verabreichung von SC-1 entnommen wurden, keine Apoptose (Figur 17a) bzw. das Vorhandensein eines intakten Tumors ohne Regression (Figur 17c) gefunden wurde, zeigte der Primärtumor nach Verabreichung von SC-1 starke Apoptose (Figur 17b) bzw. eine starke Regression (Figur 17d).

Patentansprüche

1. Glykoprotein umfassend mindestens einen Abschnitt der Aminosäuremehrstruktur von CD55 und eine tumorspezifische Glykostruktur.

2. Glykoprotein nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Glykostruktur mit dem monoklonalen Antikörper SC-1
reagiert.

3. Glykoprotein nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
daß es bei SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ein scheinbares
Molekulargewicht von 82 kD aufweist.

4. Verfahren zur Gewinnung eines Glykoproteins nach einem der
Ansprüche 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet,
daß man Membranpräparationen aus Zellen der humanen Adenokarzinomzelllinie 23132 herstellt und daraus das Glykoprotein durch
Größenausschluß- und/oder Anionenaustauschchromatographie
gewinnt.

5. Verwendung eines Glykoproteins nach einem der Ansprüche 1 bis 3
in einem Testverfahren, bei dem die Bindefähigkeit einer Substanz an
das Glykoprotein bestimmt wird.

6. Verwendung nach Anspruch 5,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Bindefähigkeit an die Glykostruktur bestimmt wird.

- 33 -

5

7. Verwendung nach Anspruch 5 oder 6,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Fähigkeit der getesteten Substanz zur Apoptose-induzierung,
insbesondere bei Tumorzellen bestimmt wird.

10

8. Verwendung nach einem der Ansprüche 5 bis 7,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Fähigkeit der getesteten Substanz zur Induzierung einer über
das Glykoprotein CD55 vermittelten Phosphorylierungskaskade
bestimmt wird.

15

9. Verwendung nach Anspruch 5 bis 8,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Glykoprotein in isolierter Form, als Zellextrakt, insbesondere
als Membranpräparation oder in Form vollständiger Zellen, ins-
besondere der humanen Adenokarzinomzelllinie 23132 eingesetzt
wird.

20

10. Verwendung nach einem der Ansprüche 5 bis 9 zur Identifizierung
von spezifisch an Tumorzellen bindefähige Substanzen.

25

11. Verwendung nach Anspruch 10 zur Identifizierung von Mitteln zur
Tumordiagnostik oder/und Tumortherapie.

12. Verwendung nach einem der Ansprüche 5 bis 11,
dadurch gekennzeichnet,
daß pharmakologisch verträgliche Substanzen getestet werden.

- 34 -

5

10

15

20

25

30

13. Verwendung nach Anspruch 12,
dadurch gekennzeichnet,
daß die getesteten Substanzen aus Peptiden, Peptidmimetika,
Antikörpern, Antikörperfragmenten und Antikörperderivaten ausge-
wählt werden.
14. Verwendung von Substanzen, die spezifisch an ein Glykoprotein nach
einem der Ansprüche 1 bis 3 binden, mit Ausnahme des monoklonal-
en Antikörpers SC-1, zur Herstellung von die Apoptose induzierenden
Mitteln.
15. Verwendung von Substanzen, die spezifisch an ein Glykoprotein nach
einem der Ansprüche 1 bis 3 binden, mit Ausnahme des monoklonal-
en Antikörpers SC-1, zur Herstellung von Antitumormitteln.
16. Verwendung von Substanzen, die spezifisch an ein Glykoprotein nach
einem der Ansprüche 1 bis 3 binden, mit Ausnahme des monoklonal-
en Antikörpers SC-1, zur Herstellung von Mitteln zur Tumordiagnos-
tik.
17. Verfahren zur Bereitstellung von die Apoptose induzierenden Mitteln,
dadurch gekennzeichnet,
daß man eine potentiell wirksame Substanz auf ihre Fähigkeit zur
spezifischen Bindung an ein Glykoprotein nach einem der Ansprüche
1 bis 3 testet und bei einem positiven Testergebnis die Substanz in
eine für pharmazeutische Anwendungen geeignete Darreichungsform
gegebenenfalls zusammen mit üblichen Hilfs-, Zusatz- und Träger-
stoffen überführt.

- 35 -

5 18. Verfahren zur Bereitstellung von Antitumormitteln,
 dadurch gekennzeichnet,
 daß man eine potentiell wirksame Substanz auf ihre Fähigkeit zur
 spezifischen Bindung an ein Glykoprotein nach einem der Ansprüche
 1 bis 3 testet und bei einem positiven Testergebnis die Substanz in
 eine für pharmazeutische Anwendungen geeignete Darreichungsform
 gegebenenfalls zusammen mit üblichen Hilfs-, Zusatz- und Träger-
 stoffen überführt.

10 19. Verfahren zur Bekämpfung von Tumoren,
 dadurch gekennzeichnet,
 daß man einem Patienten eine antitumorwirksame Menge einer an ein
 Glykoprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 3 spezifisch bindefähigen
 Substanz mit Ausnahme des monoklonalen Antikörpers SC-1
 verabreicht.

15 20. Verfahren zur Diagnose von Tumoren,
 dadurch gekennzeichnet,
 daß man eine zu testende Probe oder einen zu testenden Patienten
 mit einer an ein Glykoprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 3
 spezifisch bindefähigen Substanz in Kontakt bringt und das Vorhan-
 densein, die Lokalisierung oder/und die Menge des Glykoproteins in
 der Probe oder im Patienten nachweist.

20 21. Verwendung von Substanzen, die spezifisch ein Glykoprotein nach
 einem der Ansprüche 1 bis 3 binden, zum Auslösen einer Phosphory-
 liierungskaskade in Tumorzellen.

25 22. Verwendung von Substanzen, die spezifisch ein Glykoprotein nach
 einem der Ansprüche 1 bis 3 binden, zur transienten Erhöhung der
 CD55/DAF-Präsentation auf Membranen von Tumorzellen.

- 36 -

23. Verwendung von Substanzen, die spezifisch ein Glykoprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 3 binden, zur Induzierung von apoptotischen Prozessen, die keine Spaltung von Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) umfassen.

5

24. Verwendung von Substanzen, die spezifisch ein Glykoprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 3 binden, zum Induzieren einer Zellzyklusarretierung in Tumorzellen.

10

25. Verwendung von Substanzen, die spezifisch an ein Glykoprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 3 binden, zur Induzierung von Apoptose bei ruhenden Tumorzellen.

0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30

26. Verwendung nach einem der Ansprüche 21 bis 25,
dadurch gekennzeichnet,

15

daß die spezifisch bindefähige Substanz den Antikörper SC-1 umfaßt.

27. Verwendung nach einem der Ansprüche 21 bis 26,
dadurch gekennzeichnet,

20

daß die Substanzen in Form von Konjugaten mit Markierungs- oder Effektorgruppen eingesetzt werden.

28. Verwendung nach einem der Ansprüche 21 bis 27,
dadurch gekennzeichnet,

25

daß die Substanzen multiple Bindungsstellen für ein Glykoprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 3 aufweisen.

29. Verwendung nach Anspruch 28,

dadurch gekennzeichnet,

30

daß die spezifisch bindefähigen Substanzen quervernetzt werden.

- 37 -

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft eine Substanz sowie ein Verfahren zur Gewinnung von
6 Antitumormitteln.

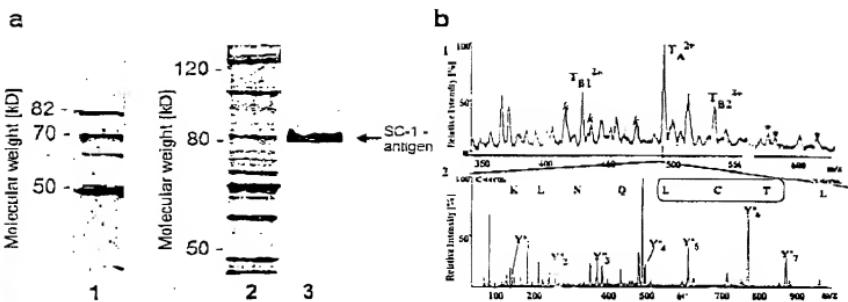
10

vp/ANM20047PWO 21. Dezember 1989

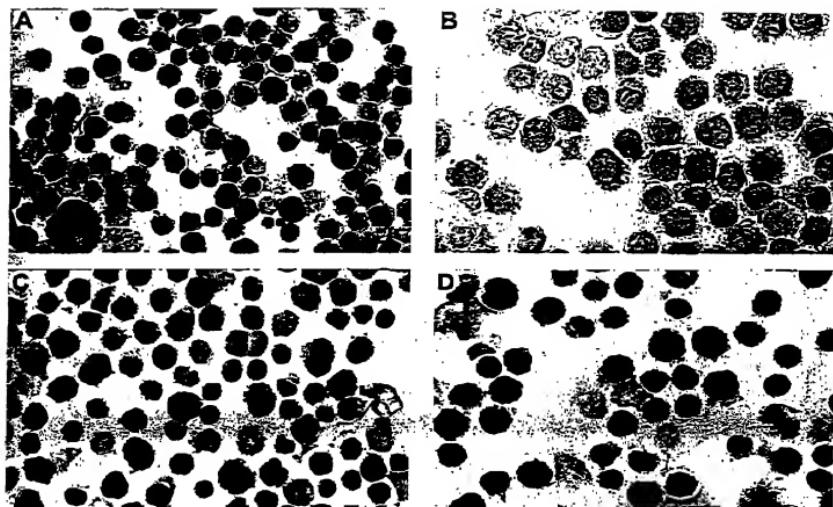
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0

1/16

Figur 1

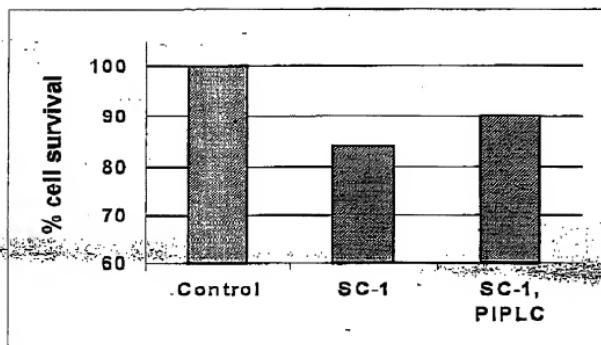


Figur 2



3/16

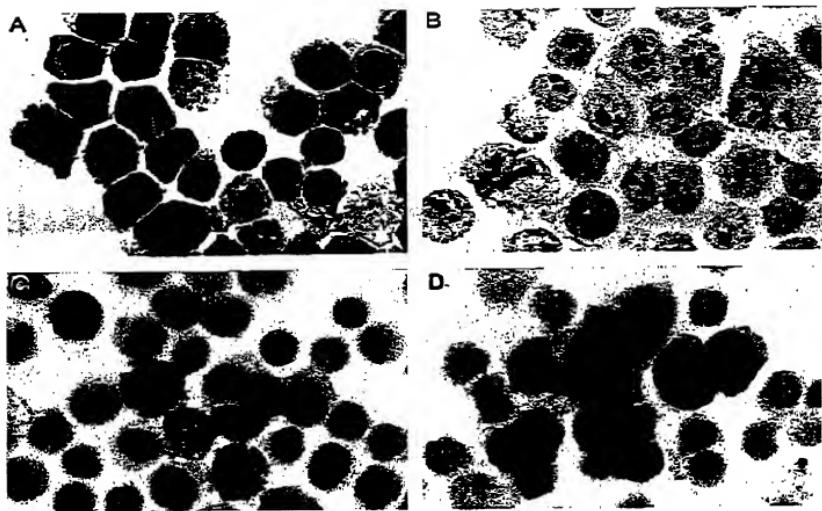
Figur 3



Phospholipase

4/16

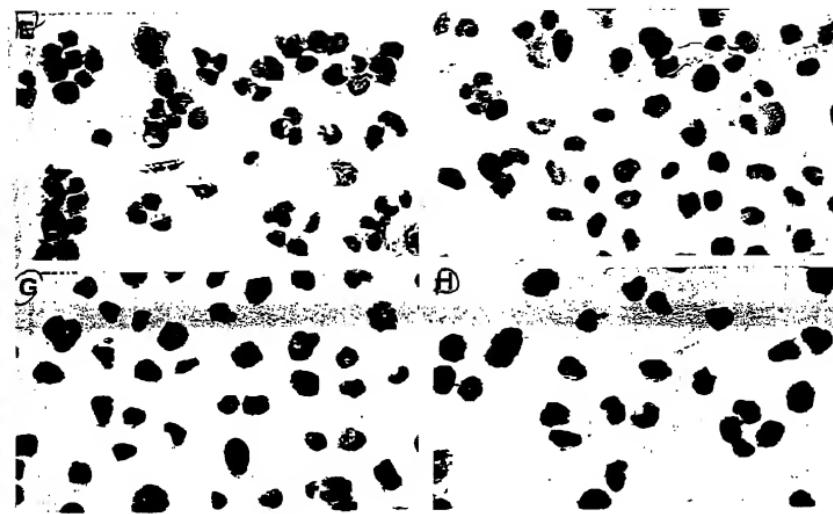
Figur 4



5/16

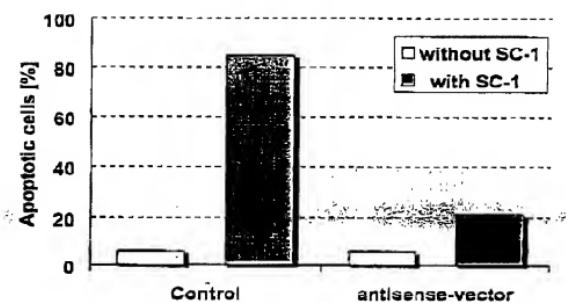
Figur 5

DRUCK: 100% 100% 100% 100% 100% 100% 100% 100% 100% 100%



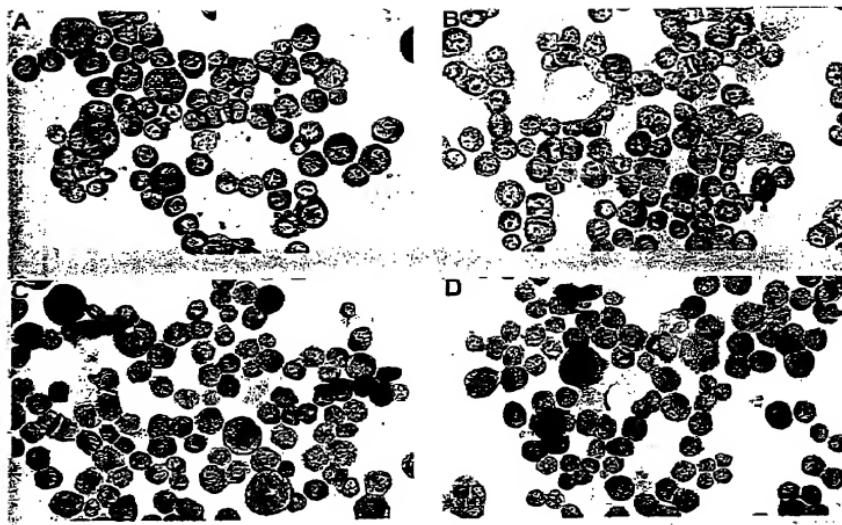
6/16

Figur 6

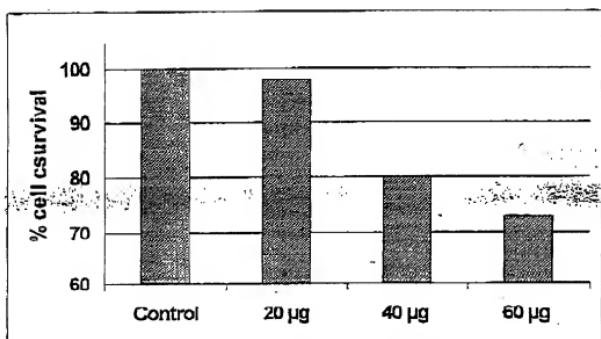


7/16

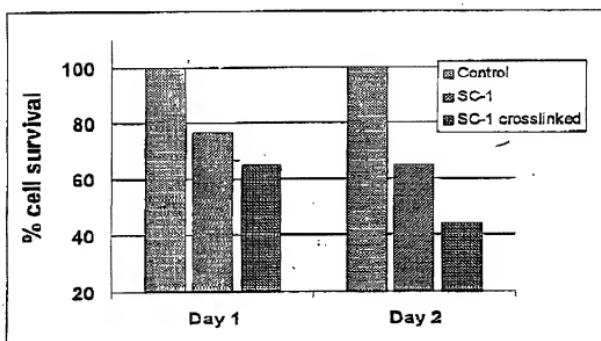
Figur 7



Figur 8

A

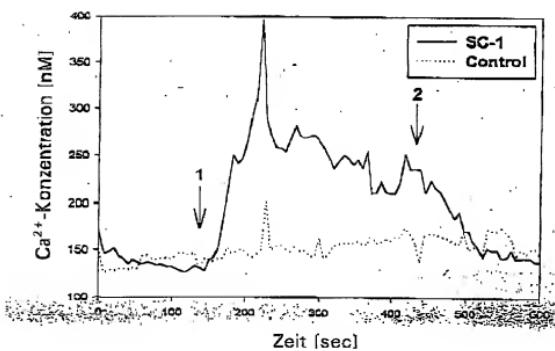
Verdünnungsreihe

B

Crosslinking

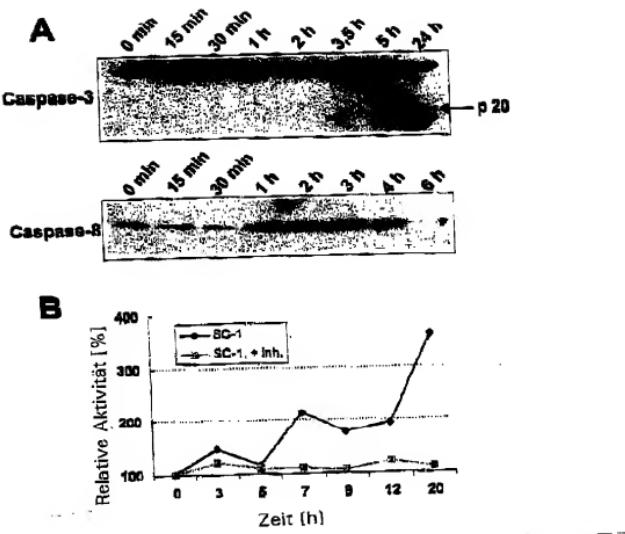
9/16

Figur 9



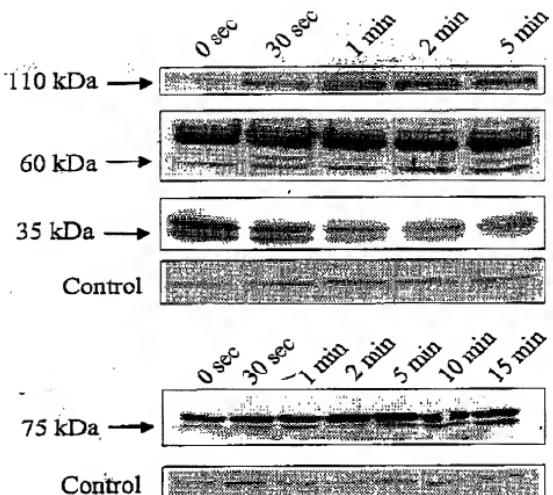
10/16

Figure 10



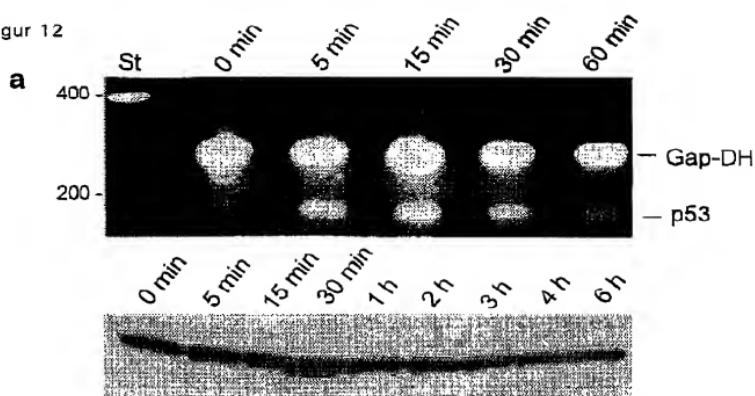
11/16

Figur 11



12/16

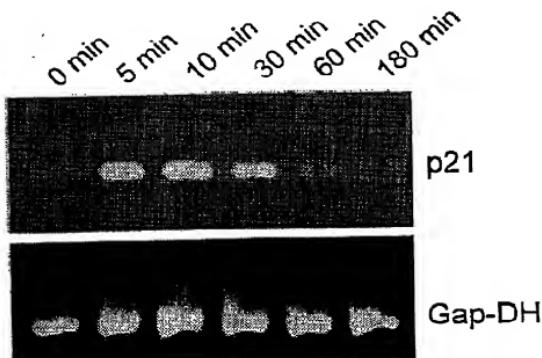
Figur 12

**b**

Codex-Nr.	265	270	275														
S	G	N	L	L	G	R	N	S	F	E	V	R	V	C	A	C	
WT	AGT	GCT	AAT	CTA	CTG	GGA	CGG	AAC	AGC	TTT	GAG	GTG	CGT	GTT	TGT	GCC	TGT
23132	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	

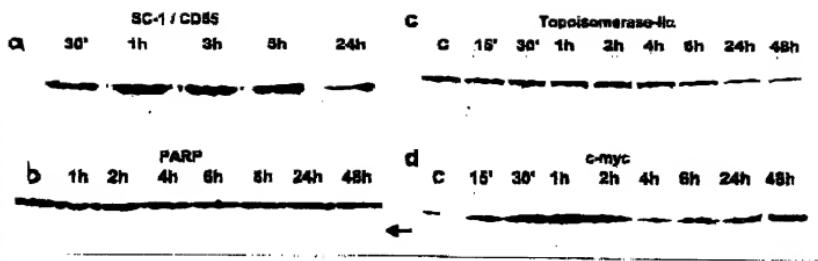
X

Figur 13



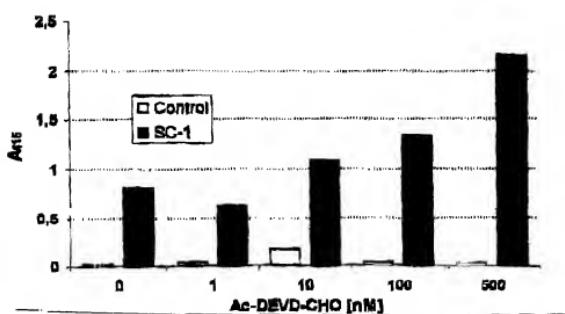
13/16

Figur 14

100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0

14/16

Figur 15



15/16

Figur 16



16/16

Figur 17

